



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 48/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/05866 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Februar 1996 (29.02.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01164		(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. August 1995 (18.08.95)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: P 44 31 401.9 24. August 1994 (24.08.94) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BLANKENSTEIN, Thomas [DE/DE]; Holbeinstrasse 43, D-12203 Berlin (DE). CAYEUX-PEZZUTTO, Sophie [DE/DE]; Am Dianaplatz 2, D-13469 Berlin (DE).			
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			

(54) Title: LIVE VACCINE FOR THE TREATMENT OF TUMOUR DISEASES

(54) Bezeichnung: LEBENDVAKZINE ZUR BEHANDLUNG VON TUMORERKRANKUNGEN

(57) Abstract

The invention concerns the preparation and use of a live tumour-cell vaccine which contains three additional genes prepared by genetic-engineering techniques: a) a gene coding for a cell-surface protein with immunostimulatory activity, b) a cytokine gene and c) the thymidine kinase gene. The fields of application of the invention are medicine and genetic engineering. The live vaccine proposed owes its effect to the fact that a synergistic anti-tumour response is induced by the multiple transfer of genes which code for immunostimulatory activity. This leads to reliable repulsion of the vaccine cells and enables cells capable of multiplying to be injected as a vaccine. As an additional safety marker, the vaccine cells are given the thymidine kinase gene which enables the vaccine cells to be selectively killed *in vivo*. The combinatory expression of genes with immunostimulatory activity improves the vaccine effect in comparison with prior art tumour-cell vaccines, and a live tumour-cell vaccine is more effective than a vaccine consisting of cells which are incapable of multiplying. The vaccine is intended for use in the genetic therapy of cancer patients.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Herstellung und Anwendung einer Lebendtumorzellvakzine, die gentechnisch hergestellt drei zusätzliche Gene enthält: a) ein Gen, welches ein Zelloberflächenprotein mit immunstimulatorischer Aktivität kodiert; b) ein Zytokingen und c) das Thymidinkinasegen. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die Gentechnik. Die Erfindung stellt eine Tumorzellvakzine dar, die dadurch ihre Wirksamkeit erhält, daß durch mehrfach-Gentransfer von Genen, die immunstimulatorische Aktivität kodieren, synergistisch eine Antitumorantwort induziert wird. Dies führt zu einer zuverlässigen Abstoßung der Vakzinzellen und erlaubt, proliferationsfähige Zellen als Vakzine zu injizieren. Als zusätzlichen Sicherheitsmarker enthalten die Vakzinzellen das Thymidinkinasegen, welches das selektive Abtöten der Vakzinzellen *in vivo* erlaubt. Die kombinatorische Expression von Genen mit immunstimulatorischer Aktivität verbessert den Vakzineffekt im Vergleich zu bisher bekannten Tumorzellvakzinien, und eine Lebendtumorzellvakzine ist wirksamer als eine Vakzine bestehend aus proliferationsunfähigen Zellen. Die Vakzine soll zur Gentherapie bei Tumorpatienten einsetzbar sein.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Lebendvakzine zur Behandlung von Tumorerkrankungen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Lebendvakzine gegen Tumorerkrankungen, ihre Herstellung und ihre Verwendung. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die Gentechnik.

Vakzine gegen Tumorerkrankungen sind seit längerem bekannt. Die klassische und vielfach klinisch eingesetzte Vakzine besteht aus einem Gemisch von bestrahlten Tumorzellen und Adjuvantien wie beispielsweise Lysate von *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) oder *Corynebacterium Parvum*. Nach zwei Jahrzehnten klinischer Erprobung läßt sich zusammenfassen, daß diese Vakzine keine reproduzierbare Wirkung zeigt (siehe Übersichtsartikel: Oettgen, H. und Old, L., *The History of Cancer Immunotherapy*, in: *Biological Therapy of Cancer*, Eds. V. DeVita, S. Hellman and S. Rosenberg, J. B. Lippincott Company 1991, S. 87-119). Jüngere Ergebnisse aus Tiermodellen haben gezeigt, daß der Transfer und die Expression mancher Zytokingene (z.B. IL2, IL4, IL7, TNF, IFN γ) das Wachstum der genmodifizierten Tumorzellen *in vivo*, nicht aber *in vitro* supprimieren kann. Diese Inhibition des Tumorwachstums ist das Ergebnis einer durch das transfizierte Zytokin induzierten Immunantwort. In vielen Fällen wird der gentransfizierte Tumor vollständig abgestoßen (siehe Übersichtsartikel: Blankenstein, Eur. J. Cancer, 1994, in press). In ähnlicher Weise kann die Expression des B7-Moleküls, ein Zelloberflächenprotein mit kostimulatorischer Aktivität, für T-Lymphozyten Tumorwachstums-inhibierend wirken. Von therapeutischer Bedeutung ist jedoch die Frage, ob die Abstoßung des gentransfizierten Tumors zu einem langzeitig anhaltenden immunologischen Gedächtnis für die Tumorzellen führt. Dies wäre dadurch zu erkennen, daß Tiere, die den gentransfizierten Tumor abgestoßen haben, später verabreichte nicht-gentransfizierte Tumorzellen ebenfalls abstoßen können. Dies ist auch in begrenztem Maße der Fall und, auf diesem Befund basierend, werden z.Z. mehrere klinische Studien durchgeführt, bei denen als Vakzine mit einem einzelnen Zytokingen versehene bestrahlte Tumorzellen eingesetzt werden (siehe Übersichtsartikel: Tepper, R. und Mule, J., 1994, Hum.

Gene Therapy 5, 153-164). Diese Studien werden als Gentherapiestudien bezeichnet.

In DE-OS 38 06 565 ist eine virusmodifizierte, tumorspezifische Vakzine beschrieben, die aus Tumorzellen vom Operationspräparat eines später zu behandelnden Patienten besteht, welche durch Bestrahlung inaktiviert und mit NDV-Virus unter sterilen Bedingungen inaktiviert wurden. Die Anwendung dieser Vakzine wurde gemäß DE-OS 39 22 444 verbessert, indem sie gemeinsam mit systemisch applizierten Zytokinen und ggf. mit Hämatopoese-stimulierenden Faktoren und/oder Anti-Suppressiva eingesetzt wird.

Der Nachteil der bisher bekannten Vakzine ist ihre geringe Wirksamkeit. Diese Behauptung beruht zum einen auf früheren Befunden, die gezeigt haben, daß der Vakzineffekt einer mit einem einzelnen Zytokinen transfizierten Tumorzelle nicht besser ist als der, der sich durch ein Tumorzell/Adjuvant-Gemisch erzielen läßt (Hock et al., 1993, Cancer Res. 53, 714-716). Tumorzell/Adjuvant-Gemische sind wie oben gesagt als klinisch nicht wirksam nachgewiesen. Zum anderen führt weder die Expression eines einzelnen Zytokins noch die Expression des B7-Moleküls alleine zu einer zuverlässigen Tumorabstoßung. D.h. ein gewisser Prozentsatz der Mäuse, die gentransfizierte Zellen injiziert bekommen haben, entwickeln nach einer Latenzzeit einen Tumor, der häufig mit einem Verlust der Zytokinproduktion einhergeht (Hock et al., 1993, PNAS 90, 2774-2778). Dies verbietet es, Tumorzellen, die mit einem einzelnen immunstimulatorische Aktivität kodierenden Gen transfiziert wurden, als Lebendtumorzellvakzine zu verwenden.

Die Erfindung hat das Ziel, die Nachteile der bekannten Vakzine, die in ihrer unzureichenden Wirksamkeit in Verbindung mit der Notwendigkeit, proliferationsunfähige Tumorzellen zu spritzen, bestehen, zu beseitigen. Es soll gentechnisch eine Lebendvakzine entwickelt werden, die das Immunsystem gegen bereits im Körper vorhandene Tumorzellen stimuliert.

Dieses Ziel wird durch eine Vakzine gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Ihre Herstellung erfolgt in autologen oder allogenen Systemen gemäß Anspruch 12 sowie ihre Verwendung gemäß der Ansprüche 13 bis 15.

Die erfindungsgemäße Lebendvakzine zur Behandlung von Tumorerkrankungen mit genmodifizierten Tumorzellen umfaßt ein Zytokin-Gen und ein immunstimulatorisches Membranprotein-Gen.

Es werden proliferationsfähige autologe oder allogene Tumorzellen eingesetzt, die zusätzlich ein oder mehrere Suizid-Gene enthalten können.

Unter Zytokinen werden Substanzen verstanden, die die Differenzierung, Proliferation und Aktivierung von Immunzellen induzieren. Gemäß der Erfindung kann die Lebendvakzine als Zytokin-Gen das Gen für Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-7, Interferon oder Granulocyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor(GM-CSF) umfassen; immunstimulatorische Membranprotein-Gene sind Proteine, die T-Zellen aktivieren, insbesondere das Gen des T-Zell-kostimulatorischen Moleküls B7.

Suizidgene sind Substanzen, die die Wirkstoffe in ein toxisches Produkt umwandeln, besonders bevorzugt ist das Thymidinkinasegen des Herpes-Simplex-Virus(HSV-TK)-Gen oder das Cytosindeaminase-gen.

Die Lebendvakzine findet Verwendung als Therapeutikum, insbesondere zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

Ausgangsbasis für die Vakzine kann jede beliebige Tumorzelle (autolog oder allogen) sein. In diese Zelle werden drei therapeutische Gene eingebracht, bei diesem Gentransfer kann es sich um jede beliebige Methode (z.B. retroviralen Gentransfer) handeln. Jedes der drei therapeutischen Gene ist an einen konstitutiv wirkenden Promotor (z.B. Moloney Murine Leukemia Virus-Long Terminal Repeat, Elongation Factor 1, Cytomegalovirus) gekoppelt. Alle drei Gene integrieren stabil und zufallsmäßig ins Genom der Tumorzelle. Die drei therapeutischen Gene können wahlweise auf einem oder verteilt auf zwei Vektoren liegen. Der erfolgreiche Gentransfer wird durch zusätzliche auf den Vektoren befindliche positive Selektionsmarker (z.B. Neomycingen, Hygromycingen) nachgewiesen.

Das **erste** Gen ist ein Zytokingen (z.B. IL4, IL7). Die meisten Zytokine haben vielfältige Funktionen und induzieren Differenzierung, Proliferation und Aktivierung verschiedener Immunzellen. Die lokale Sekretion des transfizierten Zytokingens durch die Tumorzellen *in vivo* führt zu einer Entzündungsreaktion und einer Aktivierung der Immunzellen (u.a. T-Lymphozyten) gegen den Tumor. Das Ergebnis ist die Abstoßung des Tumors in den meisten, aber nicht in allen Fällen. Nur ein Teil der Tiere, die den Zytokingen-transfizierten Tumor abgestoßen haben, sind immun gegen den Tumor. Das **zweite** Gen kodiert für ein Zelloberflächenprotein mit immunstimulatorischer Aktivität (z.B. B7). B7 wird normalerweise auf antigenpräsentierenden Zellen ausgeprägt und dient über die Interaktion mit seinen Liganden CD28 oder CTLA-4 als kostimulatorisches Signal für die Aktivierung von T-Lymphozyten. In Abwesenheit von B7 werden über den T-Zellrezeptor stimulierte T-Lymphozyten in einen Zustand der Anergie getrieben. B7-Gen-transfizierte Tumorzellen stimulieren *in vivo* eine T-Zell-vermittelte Immunantwort, die aber nur teilweise zur Tumorabstoßung führt und in einem moderaten Vakzineffekt resultiert. Das **dritte** Gen ist ein sogenanntes 'Suizid'-Gen (z.B. das Thymidinkinasegen des Herpes Simplex-Virus, HSV-TK). Die HSV-TK kann das nicht-toxische Gancyclovir in ein toxisches Produkt umwandeln. Dies erlaubt, durch systemische Gancyclovirgabe selektiv HSV-TK-exprimierende Tumorzellen abzutöten ohne normales Gewebe zu schädigen. Das HSV-TK-Gen dient als zusätzlicher Sicherheitsmarker zum Abschalten der Lebendtumorzellvakzine.

Die erfindungsgemäße gentechnisch hergestellte Tumorzellvakzine verliert ihre Wirksamkeit, wenn proliferationsunfähige Zellen verwendet werden (z.B. durch Bestrahlung oder Mitomycin C-Behandlung). Bei bisher an Menschen getestete Vakzinen wurden die Tumorzellen bestrahlt, da das Auswachsen der Vakzinzellen als Tumor ein Sicherheitsrisiko darstellte. Im Gegensatz zu den mit einem einzelnen Gen transfizierten Tumorzellen führt der Doppelgentransfer eines Zytokingens und des B7-Gens zu einer 100%igen Tumorabstoßung. Dieser durch die Erfindung erreichbare, überraschende synergistische Effekt zweier Gene, die immunstimulatorische Aktivität kodieren, ermöglicht den Einsatz einer Lebendzellvakzine, die durch die Option der Aktivierung des HSV-TK-Gens durch Gancyclovir zusätzlich gesichert ist. Die Vakzine zeichnet sich weiter dadurch aus, daß sie durch Zytokin- und B7-Gentransfer eine höhere Wirksamkeit bekommt im Vergleich zu jeweils nur mit einem der beiden Gene transfizierten Zellen.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Anwendungsbeispiel

1. Expression von Zytokin-, B7- und HSV-TK-Genen in Tumorzellen

cDNAs für Zytokin-, B7- und HSV-TK-Gene können mit geeigneten Primern durch die Polymerasenkettenreaktion isoliert und in entsprechende (retrovirale) Vektoren kloniert werden. Mit Hilfe bekannter Verpackungszelllinien (Pa317, Psi2) werden Retroviren hergestellt und mit diesen Maustumorzellen (Plasmacytom J558L und Mammaadenocarcinom TSA) infiziert. Der erfolgreiche Gentransfer wird durch Selektionsmarker (Neomycingen, Hygromycingen), die sich auf den Vektoren befinden, sichergestellt. Die Expression der Zytokingene wird durch kommerziell erhältliche ELISAs oder einen biologischen Assay nachgewiesen. IL4 kann beispielsweise durch die IL4-abhängige Proliferation von CT.4S-Zellen, IL7 durch die IL7-abhängige Proliferation der Zelllinie IXN bestimmt werden. B7-Expression wird durch Färbung der Tumorzellen mit einem fluoreszensmarkierten anti-B7-Antikörper bestimmt. Die Expression des HSV-TK-Gens wird überprüft, indem man Gancyclovir (1-10 µg/ ml) für einen Zeitraum von

10-14 Tagen dem Kulturmedium beifügt und das Abtöten der Tumorzellen bestimmt. Es werden Zelllinien hergestellt, die entweder nur IL4/ IL7 oder B7 , bzw. beide Gene zusammen exprimieren. Zusätzlich enthalten die Zellen das HSV-TK-Gen.

2. Abstoßung der Tumorzellvakzine durch IL4/IL7 und B7

Vier Millionen J558L, J558-IL4, J558-B7, J558-IL4/B7, und 1 Millionen TSA, TSA-IL7, TSA-B7 und TSA-IL7/B7 Tumorzellen werden 6-8 Wochen alten syngenen BALB/c-Mäusen subkutan injiziert und das Tumorzustum über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten verfolgt. Nicht-gentransfizierte oder Mock-transfizierte Tumorzellen wachsen in allen Fällen als Tumor. Zwischen 17.6 und 65% der Mäuse, die nur mit einem einzelnen Gen transfizierte Tumorzellen bekommen haben, entwickeln ebenfalls einen Tumor. In keinem der beiden Tumormodelle (J558L und TSA) waren IL4/IL7- und B7-kotransfizierte Tumorzellen auch nur in einem einzigen Fall in der Lage, als Tumor zu wachsen. Es wurden insgesamt 100 Mäuse analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Abstoßung genmodifizierter Tumorzellen in BALB/c-Mäusen

Injizierte Tumorzellen	Anzahl der Mäuse mit Tumor/ Mäuse im Experiment	in%
J558L	20/20	100
J558-IL4	6/34	17.6
J558-B7	14/59	23.7
J558-IL4/B7	0/80	0
TSA	20/20	100
TSA-IL7	6/20	30
TSA-B7	13/20	65
TSA-IL7/B7	0/20	0

3. Abstoßung der Tumorzellvakzine durch Gancyclovir

Da die Zytokin/B7-gentransfizierten Tumorzellen zuverlässig abgestoßen wurden, wurde die HSV-TK-Genmarkierung als Sicherheitsmarker an nur mit dem HSV-TK-Gen markierten TSA-Zellen getestet. Eine Million TSA- oder TSA-TK-Zellen wurden subkutan in BALB/c-Mäuse injiziert. Einen Tag später wurden die Mäuse für einen Zeitraum von 5 Tagen intraperitoneal mit 150 mg/ Kg Körpergewicht Gancyclovir oder Saline behandelt. Die Gancyclovir-Behandlung hatte keinen Einfluß auf das Tumorwachstum parentaler TSA-Zellen (10/10 Mäuse mit Tumor), TSA-TK-Zellen wuchsen als Tumor in nicht-behandelten Mäusen (10/10 Mäuse mit Tumor), wurden aber in Gancyclovir-behandelten Mäusen in den meisten Fällen eliminiert (2/10 Mäuse mit Tumor). Das HSV-TK-Gen wirkt somit bereits allein als Sicherheitsmarker und sollte gemeinsam mit dem oben beschriebenen synergistischen Zytokin/B7-Effekt ein zuverlässiges Abschalten der Lebendtumorzellvakzine sicherstellen.

4. Wirksamkeit der genmodifizierten Tumorzellvakzine

BALB/c-Mäuse wurden subkutan mit 4 Millionen Zellen immunisiert. Es gab Gruppen immunisiert mit J558L-, J558-IL4-, J558-B7-, J558-IL4/B7-Zellen und eine Gruppe mit J558L/C.Parvum-Adjuvant. Mit Ausnahme der J558L-Zellen, die durch Bestrahlung proliferationunfähig gemacht wurden, wurden alle Zellen lebend injiziert. Nach drei Wochen wurden den Mäusen kontralateral 4 Millionen parentale Tumorzellen ('Challenge'-Tumor) injiziert und das Tumorwachstum verfolgt. Das Ergebnis wie in Tabelle 2 dargestellt zeigt, daß der Vakzineffekt der J558-IL4/B7-Zellen größer war als der der J558-IL4- oder J558-B7-Zellen oder des Tumorzell/Adjuvant-Gemischs.

Tabelle 2. Vakzineffekt der genmodifizierten Tumorzellvakzine

Vakzinzellen	Mäuse mit 'Challenge'-Tumor/ Mäuse im Experiment	in %
keine	20/20	100
J558L, bestr.	20/20	100
J558-IL4	12/28	43
J558-B7	18/48	38
J558-IL4/B7	11/50	22
J558/Adjuvant		

5. Vakzineffekt lebender gegenüber bestrahlten Tumorzellen

Alle bisher an Patienten eingesetzten Tumorzellvakzine wurden aus Sicherheitsgründen in bestrahlter Form verwendet, da mit einem einzelnen Gen transfizierte Tumorzellen oder Tumorzellen mit Adjuvant gemischt häufig als Tumor auswachsen. Der Befund, daß die oben beschriebenen dreifach-gentransfizierten Tumorzellen zuverlässig abgestoßen werden, ermöglicht, sie als Lebendvakzine einzusetzen. Dadurch wird die Wirksamkeit der Vakzine gesteigert. Immunisiert man nämlich BALB/c-Mäuse mit 4 Millionen lebenden, bzw. bestrahlten J558-IL4/B7-Zellen und injiziert 3 Wochen später 4 Millionen parentale J558-Zellen kontralateral, entwickeln 60% (6/10) der mit bestrahlten Zellen immunisierten Mäuse einen Tumor, aber 0% (0/10) der mit lebenden Zellen immunisierten Mäuse.

7. Vakzinierungseffektivität

Die Vakzinierungseffektivität IL-7/B7.1 koexprimierender Zellen ist höher als die nur mit einem einzelnen Gen transfizierenden Zellen und als die eines Tumorzell/Adjuvanz (*C. parvum*)-Gemisches.

Um die Vakzinierungsstärke IL-7/B7.1 kotransfizierter TSA Zellen mit der des klinisch umfangreich getesteten Adjuvanz *C. parvum* oder mit nicht proliferierenden TSA-Zellen zu vergleichen, wurden Gruppen von Mäusen mit $2,5 \times 10^5$ lebensfähigen TSA-IL7, -B7.1, -IL7/B7.1 oder Ursprungszellen gemischt mit *C. parvum* immunisiert. Zusätzlich wurden Mäuse mit bestrahlten (5000 oder 10000 Rad) TSA oder TSA-IL7/B7.1 Zellen oder TSA Zellen, die mit Mitomycin C ($60 \mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt wurden, immunisiert. Tumorfreien Mäusen wurden 2 Wochen später als Gegenprobe an einer anderen Stelle $2,5 \times 10^5$ nichtmodifizierte Zellen injiziert ('Challenge'-Tumor). In Abb. 1 wird die Häufigkeit von Tumoren, und zwar der, die aus den Vakzinzellen und der, die aus den später verabreichten Parentalzellen herauswachsen, gezeigt. Das Tumorwachstum der Vakzinzellen wurde nur dann in allen Mäusen verhindert, wenn die Zellen mit 10000 Rad bestrahlt wurden oder wenn IL-7/B7 kotransfizierte Zellen für die Immunisierung verwendet wurden. 80% (8/10) der Mäuse, die mit 10000 Rad bestrahlten Parentalzellen immunisiert wurden, und 30% (3/10) der Mäuse, die mit 5000 Rad bestrahlten Parentalzellen immunisiert wurden, entwickelten einen Tumor von den später verabreichten Parentalzellen. In der letztgenannten Gruppe entwickelten 20% (2/10) einen Tumor von den Vakzinzellen. In analoger Weise entwickelten 80% (8/10) der Mäuse, die mit Mitomycin C behandelten TSA-Zellen immunisiert waren, einen Tumor (20% primären Tumor, 60% 'challenge' Tumor). In der Tumorzell/*C. parvum*-Gruppe entwickelten 25% (5/20) der Mäuse einen Tumor von den Vakzinzellen und 5% (1/20) von den 'Challenge'-Zellen. Von denjenigen Mäusen, die die TSA-B7.1 Vakzinzellen abgestoßen hatten (60%, 12/20), entwickelten 5% (1/20) einen 'Challenge' - Tumor. Im Gegensatz dazu entwickelten die mit TSA-IL7 vorbehandelten Mäuse in 25% der Fälle (5/20) einen 'Challenge'-Tumor und 5% (1/20) einen Tumor von den

Vakzinzellen. Mit anderen Worten führte B7 exprimiert durch die Tumorzellen zu einer vergleichsweise schlechten Tumorabstoßung, aber gutem Vakzineffekt, während IL-7 bessere Abstoßung der Vakzinzellen bewirkte, aber einen schlechteren Vakzineffekt. B7.1 und IL-7 aktivieren das Immunsystem daher in verschiedener und komplementärer Weise. Da nur TSA-IL-7/B7.1 Vakzinzellen in allen Mäusen vollständig abgestoßen wurden und einen Schutz gegenüber Tumorwachstum der später verabreichten Parentalzellen in 19/20 (95%) der Mäuse verursachten, wirken IL-7 und B7 in synergistischer Weise.

Sämtliche der oben genannten Immunisierungsexperimente mit transfizierten Tumorzellen wurden mit lebenden Zellen durchgeführt. Es wurde weiterhin der Vakzinierungseffekt von lebenden TSA-IL-7/B7 Zellen, die für die Immunisierung verwendet wurden, mit dem der selben Zellen verglichen, die vor der Injektion mit 10000 Rad bestrahlt wurden. 95% (19/20) der Mäuse, die mit lebenden Zellen, aber nur 30% (3/10) der Mäuse, die mit bestrahlten Zellen immunisiert waren, waren in der Lage, den 'Challenge'-Tumor abzustoßen (Abb. 1). Die beschriebene Vakzine erhält ihre Wirksamkeit daher durch den synergistischen Effekt von IL-7 und B7 und die Verwendung von proliferationsfähigen Zellen.

8. Phänotypische Beschreibung von T-Lymphocyten in transfizierten Tumoren und das Wachstum von Tumorzelllinien in nackten und SCID-Mäusen

Zur Untersuchung des zellulären Mechanismus der IL-7/B7.1 induzierten Tumorabstoßung wurde eine Immunofluoreszenz-Analyse der den Tumor infiltrierenden T-Zellen durchgeführt. Dazu wurden parentale TSA-Zellen, TSA-IL7-, TSA-B7.1- und TSA-IL7/B7.1-Zellen subkutan in Balb c Mäuse injiziert und nach 6, 8, und 10 Tagen die Tumorknötchen isoliert, Einzelzellsuspensionen präpariert und Zellen gefärbt unter Verwendung der Immunofluoreszenz mit mAbs gegen CD4, CD8, CD25 und CD28. Die Prozentsraten von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen unter den infiltrierten Zellen sind in Tabelle 4 gezeigt, während die Prozentsraten von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, die mit CD28⁺ und CD25⁺ (p55 IL2 Rezeptor) koexprimiert werden, in Tabelle 5 gezeigt sind. Sowohl

CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen waren in TSA-B7 vermehrt in Vergleich zu den Parentaltumoren. In TSA-IL7 Tumoren war ein Ansteigen von CD4⁺ T Zellen zu beobachten. T Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) waren nicht weiter erhöht in IL7/B7 transfizierten Tumoren. Jedoch offenbart die Doppelfluoreszenz-Färbung für die T Zell-Subtypenmarker CD4 und CD8 sowie die Aktivierungsmarker CD28 und CD25 phänotypisch verschiedene T Zellen in IL7 oder B7 transfizierten Tumoren. In TSA-B7 Tumoren sind die T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) zu einem hohen Prozentsatz CD28⁺, aber die meisten T Zellen sind CD25⁻. Im Gegensatz dazu sind die T-Zellen in TSA-IL7 Tumoren hauptsächlich CD25⁺ und CD28⁻ Zellen im wesentlichen abwesend. Zum Vergleich wurden in Parentaltumoren nur wenige CD28⁺ und so gut wie keine CD25⁺ T Zellen nachgewiesen. Wichtig ist, daß in TSA-IL7/B7 Tumoren die meisten CD4⁺ und CD8⁺ Zellen CD25⁺ und CD28⁺ sind. In Zusammenhang mit der Tatsache, daß nur IL7/B7 kotransfizierte Zellen zuverlässig abgestoßen wurden und eine sehr starke systemische Tumorimmunität induzierten (siehe oben), ist die lokale IL-7 Sekretion und B7 Expression durch die Tumorzellen in besonderem Maße geeignet, die Aktivierung der den Tumor infiltrierenden Lymphozyten zu bewirken. Zur Demonstration, daß die konzertierte Tumorsuppressionsaktivität von IL7 und B7 einzig und allein über T Zellen eintritt, wurden IL-7, B7, IL-7/B7 transfizierte TSA Zellen und zum Vergleich parentale oder mit einem Kontrollvektor transfizierte TSA Zellen in nackte und SCID-Mäuse injiziert und die Tumorwachstumskinetiken wurden verglichen. Wie in Tabelle 6 zu sehen ist, ist weder die IL-7 Sekretion noch die B7 Expression durch Tumorzellen noch beide zusammen in der Lage, die Tumorbildung in einem der immundefizienten Mäusestämme zu verzögern, was die absolute Erfordernis von T-Zellen für die IL-7 und B7 induzierte Antitumor Immunantwort belegt.

Tabelle 3

Prozentraten von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen unter den tumorinfiltrierenden Zellen

Tumorzelllinie	% positive Zellen*	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺
TSA	15.7 ⁺ /-4.0	9.7 ⁺ /-5.0
TSA-B7.1	46.3 ⁺ /-2.1	24.0 ⁺ /-3.6
TSA-IL7	30.0 ⁺ /-7.2	10.0 ⁺ /-1.7
TSA-IL7/B7.1	28.6 ⁺ /-4.0	14.3 ⁺ /-9.3

Tabelle 4

Prozentraten von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, die CD28⁺, bzw. CD25⁺ Marker ausprägten

Tumorzell- linie	% CD4 ⁺ Zellen*		% CD8 ⁺ Zellen*	
	CD28 ⁺	CD25 ⁺	CD28 ⁺	CD25 ⁺
TSA	14.3 ⁺ /-6.0	0.0 ⁺ /-0.0	14.0 ⁺ /-12.0	0.0 ⁺ /-0.0
TSA-B7.1	48.0 ⁺ /-20.2	13.7 ⁺ /-3.5	65.3 ⁺ /-37.8	22.0 ⁺ /-11.0
TSA-IL7	7.6 ⁺ /-0.6	39.0 ⁺ /-7.5	4.3 ⁺ /-7.5	56.3 ⁺ /-31.5
TSA-IL7/B7.1	67.0 ⁺ /-21.6	55.3 ⁺ /-25.0	67.6 ⁺ /-28.0	67.7 ⁺ /-15.6

* Tumor infiltrierte Zellen wurden unter Verwendung der Immunofluoreszenz mit mAbs gefärbt. Für jeden Versuch wurde 5 Mäusen 2.5×10^5 der jeweiligen Zellen injiziert, und nach 8 Tagen wurden die Tumore isoliert. Für jede Gruppe wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. ⁺/SD bedeutet Standardabweichung.

Tabelle 5

Analyse des Tumorwachstums von TSA Tumorzelllinien in immunodefizienten Mäusen

Tumorzelllinien	nu/nu	SCID
TSA	5/5 (19 ⁺ /-2)	5/5 (20 ⁺ /-2)
TSA-TK	5/5 (19 ⁺ /-1)	5/5 (20 ⁺ /-1)
TSA-B7.1	5/5 (21 ⁺ /-2)	5/5 (20 ⁺ /-2)
TSA-IL7	5/5 (22 ⁺ /-3)	5/5 (22 ⁺ /-1)
TSA-IL7/B7.1	5/5 (22 ⁺ /-0)	5/5 (21 ⁺ /-1)

Die genannten Zellen (2.5×10^5) wurden subkutan in die Mäusestämme injiziert. Tumorinzidenz und Tumorlatenz (in Klammern) sind gegeben.

Patentansprüche

1. Lebendvakzine zur Behandlung von Tumorerkrankungen mit genmodifizierten Tumorzellen umfassend
 - ein Zytokin-Gen und
 - ein immunstimulatorisches Membranprotein-Gen.
2. Lebendvakzine nach Anspruch 1, wobei die Tumorzellen zusätzlich ein oder mehrere Suizid-Gene enthalten.
3. Lebendvakzine nach Anspruch 1 und 2, wobei die Tumorzellen
 - ein Zytokin-Gen,
 - ein immunstimulatorisches Membranprotein-Gen und
 - ein Suizid-Genenthalten.
4. Lebendvakzine nach einem der Ansprüche 1-3, wobei als Tumorzellen proliferationsfähige autologe oder allogene Tumorzellen eingesetzt werden.
5. Lebendvakzine nach Anspruch 1-4, wobei das Zytokin-Gen durch Transfektion erhalten wurde.
6. Lebendvakzine nach Anspruch 1-5, wobei Zytokine Substanzen sind, die die Differenzierung, Proliferation und Aktivierung von Immunzellen induzieren.
7. Lebendvakzine nach Anspruch 1-6, wobei die Tumorzellen als Zytokin-Gen umfassen
 - das Gen für Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-7, Interferon- oder Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF).
8. Lebendvakzine nach Anspruch 1-7, wobei die immunstimulatorischen Membranprotein-Gene Proteine codieren, die T-Zellen aktivieren.

9. Lebendvakzine nach Anspruch 1, 3 und 8, wobei das immunstimulatorische Membranprotein-Gen das Gen des T-Zell-kostimulatorischen Moleküls B7 ist.

10. Lebendvakzine nach Anspruch 1-3, wobei Suizidgene Substanzen sind, die Wirkstoffe in ein toxisches Produkt umwandeln.

11. Lebendvakzine nach einem der Ansprüche 1-3 oder 10, wobei das Suizidgen das Thymidinkinasegen des Herpes-Simplex-Virus(HSV-TK)-Gen oder das Cytosindeaminasegen ist.

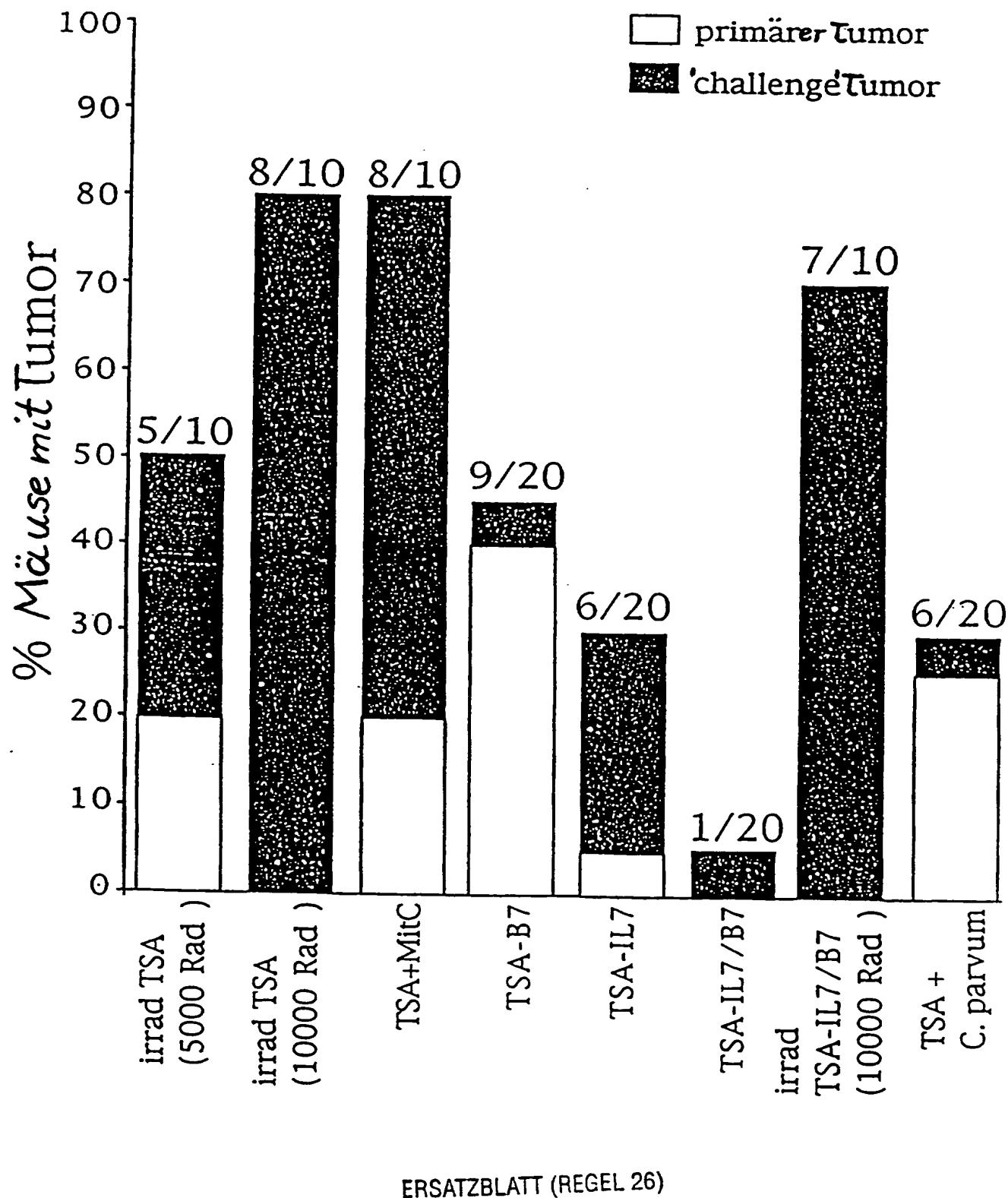
12. Verfahren zur Herstellung einer Lebendvakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 11 in autologen oder allogenen Systemen.

13. Lebendvakzine nach einem der Ansprüche 1-11 zur Verwendung als Therapeutikum

14. Verwendung eines Lebendvakzins nach einem der Ansprüche 1-11 zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

15. Verfahren zur Herstellung von Lebendvakzinen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Behandlung von Tumorerkrankungen

Abb. 1





(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 48/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/05866 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Februar 1996 (29.02.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01164		(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. August 1995 (18.08.95)		(70) Prioritätsdaten: P 44 31 401.9 24. August 1994 (24.08.94) DE	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BLANKENSTEIN, Thomas [DE/DE]; Holbeinstrasse 43, D-12203 Berlin (DE). CAYEUX-PEZZUTTO, Sophie [DE/DE]; Am Dianaplatz 2, D-13469 Berlin (DE).	
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		(76) Veröffentlichung Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 11. April 1996 (11.04.96)	

(54) Title: LIVE VACCINE FOR THE TREATMENT OF TUMOUR DISEASES

(54) Bezeichnung: LEBENDVAKZINE ZUR BEHANDLUNG VON TUMORERKRANKUNGEN

(57) Abstract

The invention concerns the preparation and use of a live tumour-cell vaccine which contains three additional genes prepared by genetic-engineering techniques: a) a gene coding for a cell-surface protein with immunostimulatory activity, b) a cytokine gene and c) the thymidine kinase gene. The fields of application of the invention are medicine and genetic engineering. The live vaccine proposed owes its effect to the fact that a synergistic anti-tumour response is induced by the multiple transfer of genes which code for immunostimulatory activity. This leads to reliable repulsion of the vaccine cells and enables cells capable of multiplying to be injected as a vaccine. As an additional safety marker, the vaccine cells are given the thymidine kinase gene which enables the vaccine cells to be selectively killed *in vivo*. The combinatory expression of genes with immunostimulatory activity improves the vaccine effect in comparison with prior art tumour-cell vaccines, and a live tumour-cell vaccine is more effective than a vaccine consisting of cells which are incapable of multiplying. The vaccine is intended for use in the genetic therapy of cancer patients.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Herstellung und Anwendung einer Lebendtumorzellvakzine, die gentechnisch hergestellt drei zusätzliche Gene enthält: a) ein Gen, welches ein Zelloberflächenprotein mit immunstimulatorischer Aktivität kodiert; b) ein Zytokingen und c) das Thymidinkinasegen. Anwendungsbereiche sind die Medizin und die Gentechnik. Die Erfindung stellt eine Tumorzellvakzine dar, die dadurch ihre Wirksamkeit erhält, daß durch mehrfach-Gentransfer von Genen, die immunstimulatorische Aktivität kodieren, synergistisch eine Antitumorantwort induziert wird. Dies führt zu einer zuverlässigen Abstoßung der Vakzinzellen und erlaubt, proliferationsfähige Zellen als Vakzine zu injizieren. Als zusätzlichen Sicherheitsmarker enthalten die Vakzinzellen das Thymidinkinasegen, welches das selektive Abtöten der Vakzinzellen *in vivo* erlaubt. Die kombinatorische Expression von Genen mit immunstimulatorischer Aktivität verbessert den Vakzineffekt im Vergleich zu bisher bekannten Tumorzellvakzinen, und eine Lebendtumorzellvakzine ist wirksamer als eine Vakzine bestehend aus proliferationsunfähigen Zellen. Die Vakzine soll zur Gentherapie bei Tumorpatienten einsetzbar sein.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 95/01164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 21959 (THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 11 November 1993 see claims ---	1-15
X	NATURAL IMMUNITY, vol. 13, no. 2-3, March 1994 - May 1994 BASEL, SCHWEIZ, pages 113-130, A. PORGADOR ET AL. 'Immunotherapy of tumor metastasis via gene therapy.' see page 126, left column, line 8 - right column, line 12 ---	1,4-8, 12-15

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 1996

Date of mailing of the international search report

20.02.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 95/01164

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IMMUNOLOGY, vol. 80, no. 3, November 1993 OXFORD, GROSSBRITANNIEN, pages 451-457, R. COSTELLO ET AL. 'Interleukin-7 is a potent co-stimulus of the adhesion pathway involving CD2 and CD28 molecules.' see the whole document ---	1, 4-9, 12-15
A	CELL, vol. 71, 24 December 1992 CAMBRIDGE, MA, VSA, pages 1093-1102, L. CHEN ET AL. 'Immunotherapy of tumor metastasis via gene therapy.' siehe 'discussion' ---	1, 4-9, 12-15
A	JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, vol. 85, no. 3, 3 February 1993 BETHESDA, MD, VSA, pages 207-216, A. BELLDEGRUN ET AL. 'Human renal carcinoma line transfected with interleukin-2 and/or interferon alpha gene(s): Implications for live cancer vaccines.' see abstract ---	1, 4-8, 12-15
A	CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol. 4, no. 6, December 1992 LONDON, GROSSBRITANNIEN, pages 619-623, D. PARDOLL 'New strategies for active immunotherapy with genetically engineered tumor cells.' see the whole document ---	1, 4-9, 12-15
P, X	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 25, no. 8, August 1995 WEINHEIM, DEUTSCHLAND, pages 2325-2331, S. CAYEUX ET AL. 'Tumor cells cotransfected with interleukin-7 and B7.1 genes induce CD25 and CD28 on tumor-infiltrating T lymphocytes and are strong vaccines.' see the whole document ---	1-15
2		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 95/01164

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	IMMUNOBIOLOGY, vol. 191, no. 2-3, September 1994 STUTTGART, DEUTSCHLAND, pages 208-209, S. CAYEUX ET AL. 'Analysis of the vaccination-efficiency of cytokine/B7-transfected tumor cells.' see the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE95/01164

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although Claim 14 is directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 95/01164

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9321959	11-11-93	AU-B-	4221793	29-11-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01164

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K48/00

nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,93 21959 (THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 11.November 1993 siehe Ansprüche ---	1-15
X	NATURAL IMMUNITY, Bd. 13, Nr. 2-3, März 1994 - Mai 1994 BASEL, SCHWEIZ, Seiten 113-130, A. PORGADOR ET AL. 'Immunotherapy of tumor metastasis via gene therapy.' siehe Seite 126, linke Spalte, Zeile 8 - rechte Spalte, Zeile 12 ---	1,4-8, 12-15

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, weil die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 24.Januar 1996	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 20.02.96
Name und Postanschrift der internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Nooij, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01164

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	IMMUNOLOGY, Bd. 80, Nr. 3, November 1993 OXFORD, GROSSBRITANNIEN, Seiten 451-457, R. COSTELLO ET AL. 'Interleukin-7 is a potent co-stimulus of the adhesion pathway involving CD2 and CD28 molecules.' siehe das ganze Dokument ---	1, 4-9, 12-15
A	CELL, Bd. 71, 24. Dezember 1992 CAMBRIDGE, MA, VSA, Seiten 1093-1102, L. CHEN ET AL. 'Immunotherapy of tumor metastasis via gene therapy.' siehe 'discussion' ---	1, 4-9, 12-15
A	JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, Bd. 85, Nr. 3, 3. Februar 1993 BETHESDA, MD, VSA, Seiten 207-216, A. BELLDEGRUN ET AL. 'Human renal carcinoma line transfected with interleukin-2 and/or interferon alpha gene(s): Implications for live cancer vaccines.' siehe Zusammenfassung ---	1, 4-8, 12-15
A	CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, Bd. 4, Nr. 6, Dezember 1992 LONDON, GROSSBRITANNIEN, Seiten 619-623, D. PARDOLL 'New strategies for active immunotherapy with genetically engineered tumor cells.' siehe das ganze Dokument ---	1, 4-9, 12-15
P, X	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 25, Nr. 8, August 1995 WEINHEIM, DEUTSCHLAND, Seiten 2325-2331, S. CAYEUX ET AL. 'Tumor cells cotransfected with interleukin-7 and B7.1 genes induce CD25 and CD28 on tumor-infiltrating T lymphocytes and are strong vaccines.' siehe das ganze Dokument ---	1-15 -/-
2		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01164

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der im Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	IMMUNOBIOLOGY, Bd. 191, Nr. 2-3, September 1994 STUTTGART, DEUTSCHLAND, Seiten 208-209, S. CAYEUX ET AL. 'Analysis of the vaccination-efficiency of cytokine/B7-transfected tumor cells.' siehe das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/DE95/01164

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für besummte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprache Nr. 14
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl Anspruch 14 sich auf ein Verfahren zur Behandlung
des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche
durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der
Zusammensetzung/Verbindung.
2. Ansprache Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprache Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprache Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt

Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01164

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9321959	11-11-93	AU-B- 4221793 CA-A- 2134763 EP-A- 0637966 JP-T- 7506370	29-11-93 11-11-93 15-02-95 13-07-95
